

**MODELOS IN VITRO E IN VIVO PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE
ABSORÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO
BIOMÉDICA**

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual
Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) -
2021/06405-9

GUILHERME AUGUSTO SOARES

**MODELOS IN VITRO E IN VIVO PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE
ABSORÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO
BIOMÉDICA**

Relatório de Pós-doutorado realizado
na Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências de
Botucatu

Supervisor: Prof. Dr. José Ricardo de
Arruda Miranda

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - 2021/06405-9

Botucatu

2023

Resumo (Retirado do projeto inicial)

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são materiais com grande potencial para aplicações na área da saúde. Nesse sentido, uma série de trabalhos utilizando o sistema de Biosusceptometria AC (BAC) como método alternativo para detecção e monitoramento de NPMs foi desenvolvida. Apesar do promissor potencial clínico das NPMs, a absorção de NPMs pelo trato gastrointestinal (TGI) ainda permanece como um desafio, e é alvo de relevantes estudos na atualidade. Dessa forma, nesse projeto é proposta a seguinte linha investigação: avaliação dos possíveis mecanismos e estratégias para se alcançar absorção de NPMs administradas por via oral. A linha de investigação será executada através do estudo de absorção in vitro de NPMs em células Caco-2, linhagem presente no trato gastrointestinal (TGI) humano que permite de investigar os mecanismos de drogas através do epitélio por diversas vias. A fim de se quantificar a internalização in vitro e a possível absorção in vivo, será empregado o sistema BAC que permite aquisições em tempo real através de imagens com alta sensibilidade. Após as etapas in vitro, serão realizadas medidas experimentais in vivo, nas quais roedores receberão doses de Lipossomos Catiônicos Magnéticos (LCMs) (encapsulados com as NPMs) para se avaliar a absorção via TGI. O projeto apresenta um perfil de execução multicêntrico devido ao fato de contar com professores de outras instituições e até mesmo com a iniciativa privada. Espera-se que esse trabalho possa atender a uma demanda crescente de inserção de nanotecnologia aplicada diretamente área de entrega de drogas por via oral e ainda na engenharia biomédica.

Nota:

Este relatório contempla as atividades realizadas pelo bolsista no período entre 01/04/2022 a 19/07/2023. É importante ressaltar que o bolsista não completou todo período previsto de pós-doutoramento devido a uma aprovação em um concurso para docente na instituição que o bolsista realizava seu projeto. Em adição, o projeto que foi submetido a FAPESP para avaliação foi o mesmo que o bolsista apresentou no seu concurso, o que foi algo extremamente positivo e pontuado durante o certame. Isso evidencia a relevância do projeto de pesquisa e seus resultados parciais, uma vez que os resultados se mostraram promissores e bastante significativos. Os resultados parciais do projeto se mostraram não apenas promissores, mas também significativos, reforçando a importância do trabalho realizado.

Agora, como docente recém-contratado, o bolsista tem a intenção de estabelecer este projeto como uma linha de pesquisa principal na instituição. Além disso, há planos para solicitar um possível auxílio da FAPESP. Este apoio poderia fortalecer o docente nesta fase de adaptação e abrir caminho para futuras publicações. Este relatório, portanto, não é apenas um resumo das atividades, mas também um prenúncio de um futuro pedido junto a FAPESP.

Realizações no período:

1) Publicações científicas:

a) Pharmacomagnetography assessment of the prokinetic effect on metronidazole absorption. (1º Autor). Journal of Pharmacy and Pharmacology. Fator de Impacto:3,765

b) Development and implementation of a tomographic system for the quantitative reconstruction of magnetic microparticles based on AC biosusceptometry sensors. (Coautor). Journal of Magnetism and Magnetic Materials (2,7)

2) Publicações científicas submetidas:

a) Accessing the Pharmacokinetics Accessing the Pharmacokinetics of Magnetic Nanoparticles in Cirrhosis-Associated Hepatocarcinogenesis by Ordinary Differential Equation Modeling and AC Biosusceptometry. (Coautor). Chaos, Solitons and Fractals: the interdisciplinary journal of Nonlinear Science, and Nonequilibrium and Complex Phenomena. Fator de Impacto:7,8

- b) Non-invasive biomagnetic assessment of gastrointestinal motility in a loperamide-induced model of constipation (Coautor). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. Fator de Impacto:1,3

3) Trabalhos apresentados em conferências internacionais:
Brazilian Materials Research Society Meeting (SBPMat)

- a) Real-Time Detection of Magnetic Nanoparticle Distribution Using Optically Pumped Magnetometers: A Pilot Study in Rats. (Oral)
- b) Magnetic Nanoparticle Biodistribution and Clearance: A Long-Term Study Using AC Biosusceptometry (Poster)
- c) Investigating the Biodistribution of Magnetic Nanoparticles in Rat Models of Cirrhosis-Induced Hepatocarcinogenesis (Poster)

4) Trabalhos apresentados em conferências nacionais:

- a) Avaliação do impacto da prucaloprida no trânsito gastrointestinal e na biodisponibilidade de comprimidos magnéticos: uma avaliação farmacomagnetografia baseada em Biosusceptometria AC. Congresso Brasileiro de Física Médica (CBFM) (Poster)

5) Plano de Gestão de dados: O plano de gestão de dados segue conforme o submetido a FAPESP no momento da submissão. Todos os dados obtidos durante a execução do projeto são armazenados na nuvem e em discos. Os dados biológicos relacionados à internalização in vitro e à biodistribuição in vivo de nanopartículas magnéticas estão coletados e exibidos em planilhas, tabelas e imagens. Esses dados estão categorizados em planilhas digitais conforme os grupos experimentais estabelecidos e a linha de pesquisa a ser seguida, facilitando a identificação do grupo experimental, a dosagem administrada e o experimento que foi realizado. Atualmente há um link para acesso aos dados:

6) Atividades experimentais realizadas:

Ao longo do período, o bolsista realizou duas viagens científicas à Universidade Federal de Goiânia, especificamente aos laboratórios cNanoMed e Farmatec, sob a supervisão da Prof. Dr. Eliana Martins Lima. Estes laboratórios estão localizados no prédio do Centro de Pesquisas LIFE, no Parque Tecnológico Samambaia na UFG. O CNanoMed é um centro multiusuário voltado para pesquisas pré-clínicas, equipado com uma variedade de dispositivos para síntese, caracterização e experimentação.

As visitas tiveram como foco a síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas e lipossomas. A presença física foi crucial devido ao perfil multicêntrico do projeto, que se baseou na utilização da expertise de cada profissional envolvido. Acreditamos que os resultados, mesmo que parciais, foram benéficos, pois o ex-bolsista, agora docente, pôde implementar tais protocolos em sua instituição.

Embora a estrutura já existisse, faltavam conhecimentos práticos e teóricos para a síntese de nanopartículas e lipossomas. Atualmente, foram incorporados equipamentos do departamento do docente que possibilitaram a elaboração de protocolos que podem ser realizados em Botucatu. Essas perspectivas estão alinhadas com o que foi proposto, principalmente por conectar diferentes centros de pesquisa, o que é extremamente positivo para a obtenção de conhecimentos e expertises e para a implementação na instituição sede.

Espera-se que esses avanços sejam avaliados positivamente durante o futuro pedido de auxílio regular junto à FAPESP, pois seria uma continuação lógica do projeto de pós-doutorado interrompido. Este projeto tem o potencial de impulsionar ainda mais a pesquisa e a inovação, fortalecendo a colaboração entre diferentes centros de pesquisa e contribuindo para o avanço da nanomedicina.

Atividades Realizadas

- *Desenvolvimento das linhagens de CaCo2*

A linhagem de células CaCo2 foram obtidas através da Chemyunion LTDA. As células foram armazenadas em frasco de cultura celular (75 cm²) com meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10%, mantidas em incubadora (37º C, com 5% de tensão de CO₂). O meio de cultura foi trocado três vezes por semana, até as células atingirem sua confluência.

- *Protocolo geral de preparo*

Após atingirem a confluência, foi realizado o processo de tripsinização com objetivo de dissociar as células da superfície aderente. Foi adicionado 3 ml de tripsina no frasco com tempo de incubação de 15 min. Dissociadas, o conteúdo foi transferido para tubo falcon e realizado a contagem das células em Câmara de Neubauer. Neste protocolo, é utilizado o reagente Trypan Blue, o qual penetra na membrana das células mortas diferenciando das viáveis. Posteriormente, as células foram plaqueadas para o desenvolvimento dos seguintes protocolos.



Figura 1. Linhagem celular CaCo2

- *Avaliações in vitro*

O projeto está sendo desenvolvido no laboratório de Biomagnetismo do Departamento de Biofísica e Farmacologia do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu, sob orientação do Prof. Titular José Ricardo de Arruda Miranda. O cultivo celular está realizado no Laboratório de Produtos Naturais e Fitoterápicos- IBB UNESP Botucatu, sob colaboração do Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi. As NPMs foram de ferrita de manganês revestidas com citrato (Cit-NPMs), fornecidas pelo laboratório de

Ressonância Ferromagnética e Nanomagnetismo do Departamento de Física da Universidade Federal de Goiânia, sob coordenação do Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis.

- *Avaliação em diferentes concentrações de NPMs da interação célula-NPMs*

Foi realizado um teste em 6 diferentes concentrações (5,25 mg/ml, 2,62 mg/ml, 1,31 mg/ml, 0,65 mg/ml, 0,32 mg/ml, 0,16 mg/ml) de NPMs com o intuito de analisar qual concentração seria mais viável para as células (Figura 2). Foi realizado o plaqueamento das células CaCo2 em placa de 6 poços, em cada poço foi adicionado: 325 μ L de células ($2 \cdot 10^6$), 2 mL de DMEM+SFB, 200 μ L de NPMs. A interação células-NPMs foi observado via microscópio invertido em diferentes tempos (1h, 6h e 24h).

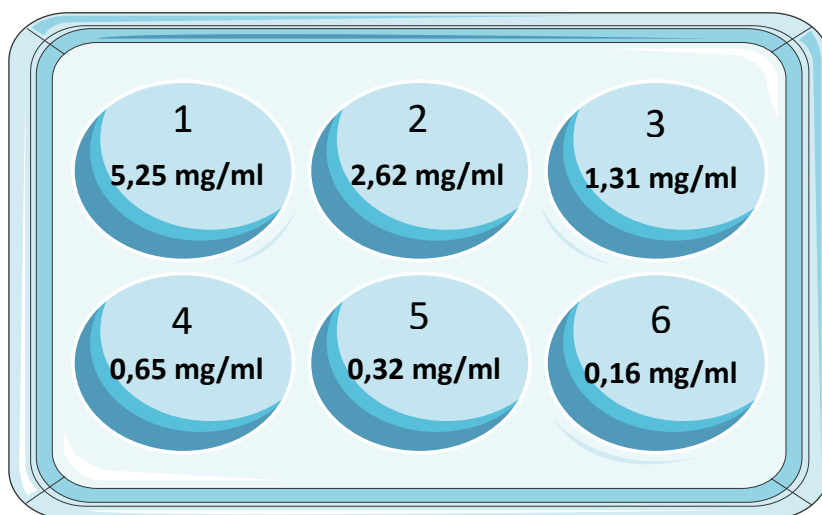


Figura 2: Diagrama do plaqueamento do protocolo.

Após 24h de interação, o sobrenadante dos poços foi coletado e o que permaneceu aderido a placa passou pelo processo de tripsinização. As amostras resultante desse protocolo foram: S – sobrenadante retirado antes do processo de tripsinização, contendo as NPMs e células que não aderiram a superfície do poço; T – NPMs e células que ficaram aderidas, e foram dissociadas pelo processo de tripsinização. Ambas as amostras foram analisadas no sensor BAC Cavidade.

- *Avaliação em diferentes tempos de interação célula-NPMs*

Neste teste, foi realizado o plaqueamento das células Caco2 em placa de 12 poços (Figura 3), em cada poço foi adicionado: 22 μ L de células ($1 \cdot 10^5$), 1,7 mL de

DMEM+SFB, 100 μ L de NPMs (0,14 mg/ml). A interação células-NPMs foi observado primeiramente via microscópio invertido em diferentes tempos (1h, 6h, 12h e 24h). Após cada tempo de interação, o sobrenadante dos poços foi coletado e realizou-se a tripsinização. As amostras resultante desse protocolo foram: S – sobrenadante retirado antes do processo de tripsinização, contendo as NPMs e células que não aderiram a superfície do poço; T – NPMs e células que ficaram aderidas, e foram dissociadas pelo processo de tripsinização. Ambas as amostras foram analisadas no sensor BAC Cavidade. Todas as amostras foram imediatamente medidas no sensor BAC Cavidade após o final de cada tempo de interação.

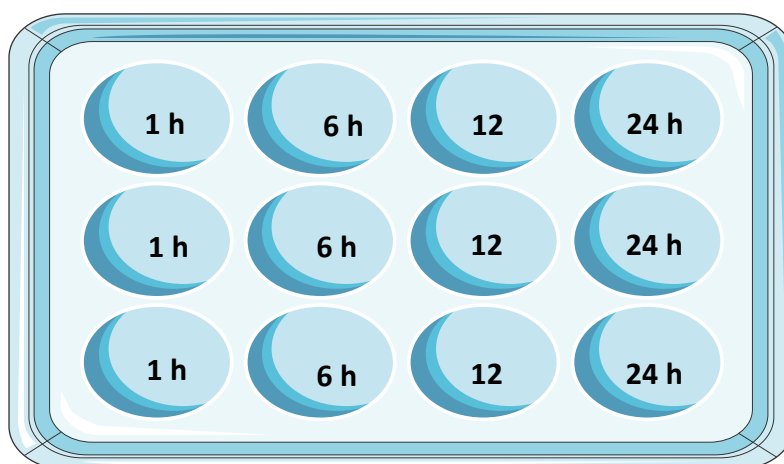


Figura 3: Diagrama do plaqueamento do protocolo.

- *Avaliação em diferentes tempos de interação célula-NPMs utilizando diferentes protocolos*

Nesta etapa, para averiguar qual substancia utilizada nos protocolos anteriores estava interagindo com as NPMs e formando agregados, foi dividido em três grupos: i) Trips.+DMEM+SFB; ii) Trips.+DMEM; iii) DMEM+SFB. Todos os grupos foram avaliados em diferentes tempos (1h, 6h, 12h e 24h) via microscópio e sinal BAC. As células CaCo2 foram plaqueadas, contendo em cada poço: 12 μ L de células (1.10^5), 1 mL de DMEM+SFB, 31,2 μ L de NPMs (2,6 mg/ml). Após cada tempo de interação, foi realizado a tripsinização nos grupos i) e ii), e no iii) foi utilizado o método mecânico para a retirada das células (rodinho). As amostras resultante desse protocolo foram: S – sobrenadante retirado antes do processo de tripsinização, contendo as NPMs e células que não aderiram a superfície do poço; T – NPMs e células que ficaram aderidas, e

foram dissociadas pelo processo de tripsinização. As amostras foram analisadas no sensor BAC Cavidade e via microscópio.

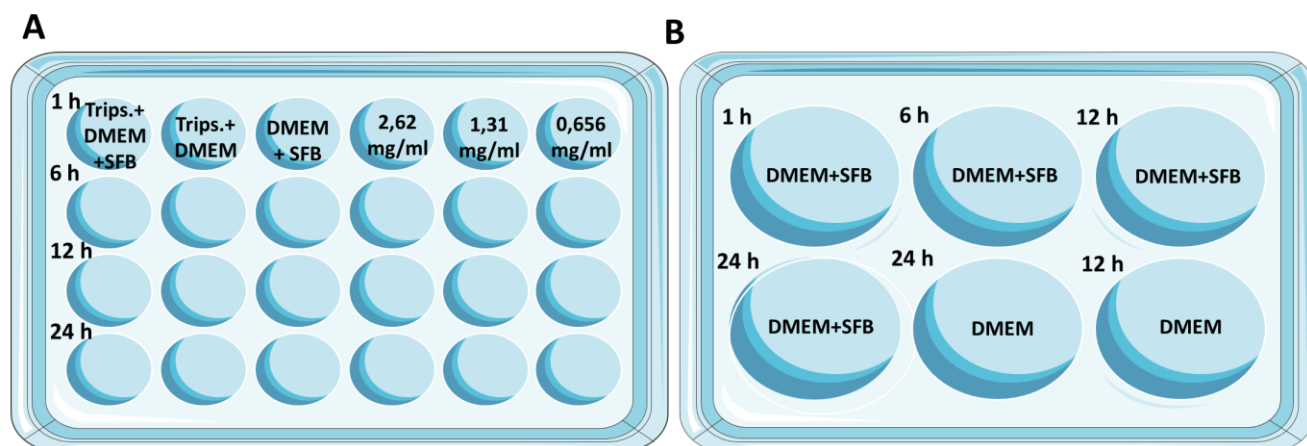


Figura 4. Diagrama do plaqueamento da CaCo2

- *Avaliação em diferentes tempos de interação célula-NPMs utilizando diferentes materiais encapsulados*

Este protocolo foi realizado em duas etapas diferentes, a primeira relacionada a síntese e encapsulamento das NPMs executados na UFG, e por fim a avaliação da interação célula-NPMs (IBB-Unesp). As NPMs dopadas com manganês (MnFe_2O_4) revestidas por citrato foram sintetizadas pelo Grupo de Nanodots Magnéticos no Instituto de Física da Universidade de Goiás sob Supervisão do Prof. Dr. Andris Bakuzis. Após a síntese, as NPMs foram levadas para o Centro de Pesquisas LIFE (Laboratórios Integrados para Inovação em Ciências Farmacêuticas), no laboratório Farmatec (Laboratório de Tecnologia e Nanotecnologia Farmacêutica), onde foram encapsuladas por quatro diferentes complexos, listados abaixo.

Grupos:

- Cit-MnFe₂O₄+Lip.: nanopartículas magnéticas encapsuladas por lipossomos
- Cit-MnFe₂O₄+Lip. +B16: nanopartículas magnéticas encapsuladas por lipídio e membrana B16
- Cit-MnFe₂O₄+Eri.: nanopartículas magnéticas encapsuladas por eritrócitos
- Cit-MnFe₂O₄+Lip. +Eri.: nanopartículas magnéticas encapsuladas por lipídio e eritrócitos.

No processo de encapsulamento, foi utilizados lipossomos sintéticos composto por SPC (Soy phosphatidylcholine) e colesterol (CHOL). Para preparar os lipossomos, foi utilizado o método de evaporação rotatória sob pressão, dissolvendo SPC e colesterol em clorofórmio para o preparo de um filme de lipídios. Posteriormente, as NPMs foram adicionadas no filme de lipídio, e a dispersão final será submetida a agitação (Banho de ultrassom - SSBu 3,8L) para concluir a formação das vesículas. Após este processo, as NPMs foram levadas para o IBB-Unesp para a execução do protocolo interação célula-NPMs e posteriores avaliações. Todos os grupos foram avaliados em diferentes tempos (1h, 6h, 12h e 24h) via microscópio e sinal BAC. As células CaCo2 foram plaqueadas, contendo em cada poço: 50 µL de células (1.105), 500 µL de DMEM+SFB, 50 µL de NPMs (2,6 mg/ml). Após cada tempo de interação, foi realizado a tripsinização (500 µL de tripsina). As amostras resultantes desse protocolo foram: S – sobrenadante retirado antes do processo de tripsinização, contendo as NPMs e células que não aderiram a superfície do poço; T – NPMs e células que ficaram aderidas, e foram dissociadas pelo processo de tripsinização. As amostras foram analisadas no sensor BAC Cavidade e via microscópio.

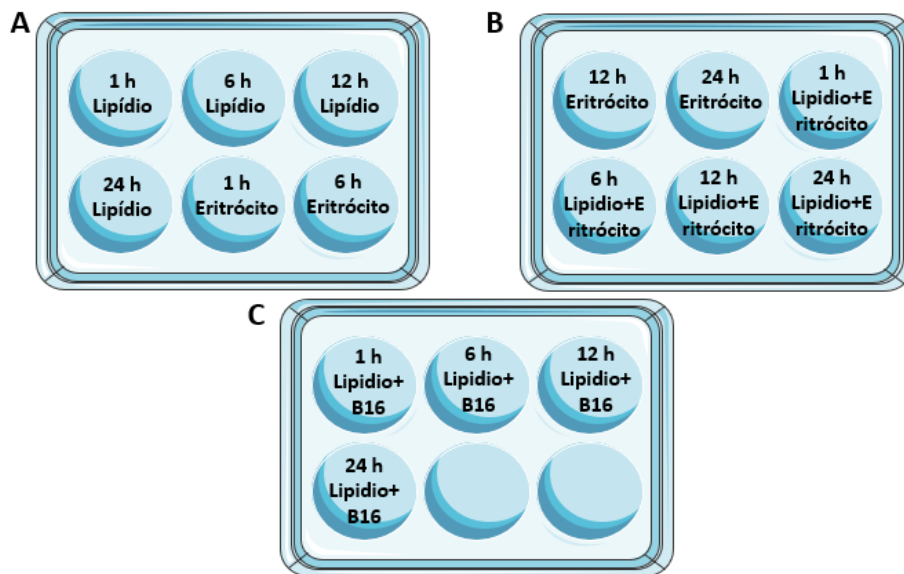


Figura 5. Esquema de representação dos *diferentes tempos de interação célula-NPMs utilizando diferentes materiais encapsulados*

Resultados e Discussão

- *Avaliações in vitro (em diferentes concentrações de NPMs)*

A Figura 6, mostra a análise microscópica realizada nos poços no tempo de 1 h e 24 h, nas diferentes concentrações. No tempo de 1 h, na concentração 1 é difícil visualizar as células, devido à alta concentração das NPMs. Na concentração 2 e 3, é possível ter uma melhor visualização das NPMs nas células. No tempo de 6 h, na concentração 1 é possível analisar que aparentemente as NPMs se alojaram entre as células. Na concentração 2 e 3, diferentemente da 1, pode se levantar a hipótese que as NPMs entraram nas células ou ficaram aderidas a membrana. O tempo de 24 h apresentou resultado similar que o tempo de 6h. Em todos os tempos analisados, as três últimas concentrações quase são imperceptíveis a visualização das NPMs.

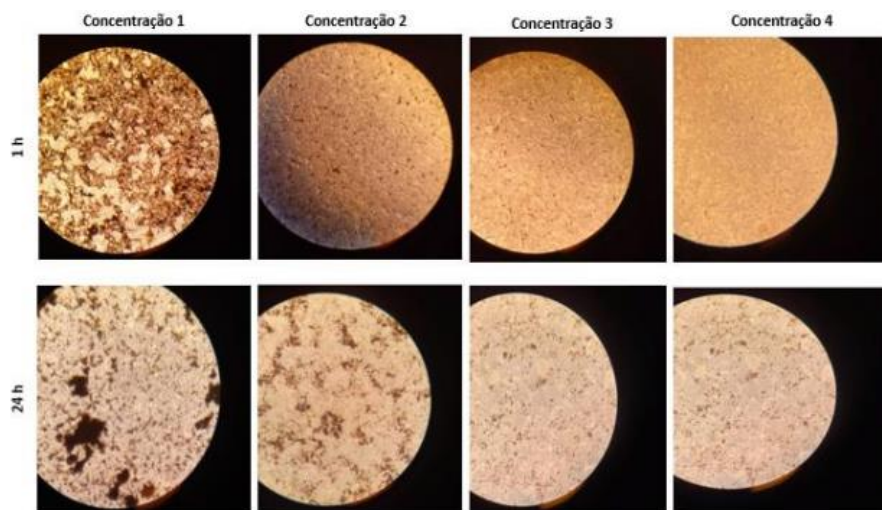


Figura 6. Imagem do microscópio invertido da interação NPMs-células em diferentes concentrações nos tempos de interação de 1 h e 24 h.

A Tabela 1, mostra o valor de intensidade de sinal (mV) das amostras medidas no sensor BAC Cavidade para as diferentes concentrações após 24h de interação células-NPMs. Os dados indicaram que o sistema BAC detectou as amostras nas concentrações 1 e 2, devido a maior concentração das NPMs. Em contrapartida as demais concentrações não foram o suficiente para sensibilizar o sistema.

Com base nos resultados obtidos nesta avaliação a próxima etapa seria avaliar a resposta do sistema BAC em função do tempo de interação. Além disso, foi levantado a hipótese que alguma substancia estava interagindo com NPMs, o que acarretou no decaimento de sinal BAC, podendo ser a tripsina ou DMEM suplementado.

Tabela 1: Intensidade de sinal das amostras S (sobrenadante) e T (tripsinizado) das amostras NPMs-células.

Intensidade de sinal (mV)	Concentração de NPMs					
	1	2	3	4	5	6
S	0,12	0	0	0	0	0
T	0,58	0,16	0	0	0	0

- *Avaliação em diferentes tempos de interação célula- NPMs*

Nas análises via BAC, não foi possível ver diferença na intensidade de sinal em todas as amostras, tanto no sobrenadante e nas NPMs e células aderidas (tripsinizado). Visualmente, as NPMs decantaram no fundo do eppendorf (Figura 7) e alguma reação ocorreu no conjugado que decaiu o sinal BAC. As analises microscópicas indicaram que

a tripsina não é uma substancia que está degradando ou provocando aglomerados nas NPMs, ela apenas auxilia no processo de dissociação das células aderidas (Figura 8).



Figura 7: Imagem das NPMs decantadas no eppendorf.

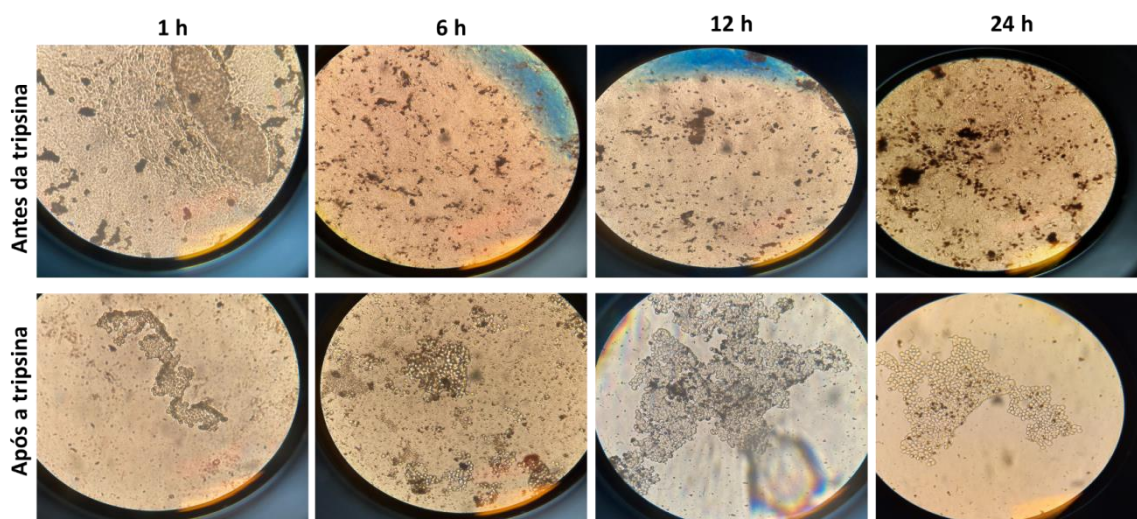


Figura 8. Imagem do microscópio invertido da interação NPMs-células

- *Avaliação em diferentes tempos de interação célula-NPMs utilizando diferentes protocolos*

Nas análises via microscópio invertido, observamos um padrão diferente das NPMs quando diluídas em DMEM e em DMEM+SFB. Este padrão pode estar associado com a formação de aglomerados (efeito corona) consequência da interação das NPMs quando em contato com o SFB, substancia rica em proteínas. Este fato, está ligado diretamente com o decaimento do sinal BAC apresentado nos resultados anteriores. Na Tabela 2, é possível observar que ainda não conseguimos analisar um padrão lógico da variação da intensidade de sinal entre as amostras. Esses resultados fortalecem a hipótese que está ocorrendo uma formação de aglomerados entre as NPMs e os

reagentes utilizados, interferindo na detecção via sinal BAC e no processo de internalização das NPMs nas células.

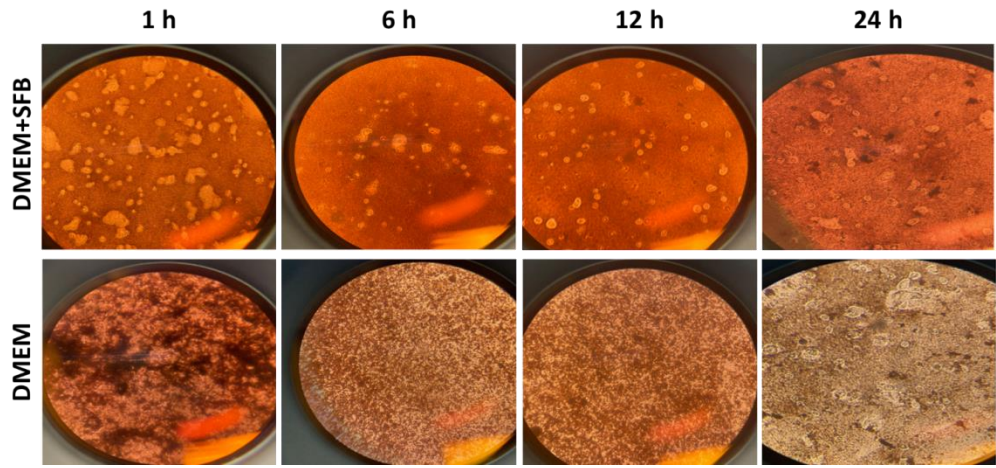


Figura 9. Imagem do microscópio invertido da interação NPMs-células CaCo2 em DMEM e em DMEM suplementado (DMEM com SFB) nos diferentes tempos de interação (1 h, 6 h, 12 h e 24 h).

Tabela 2. Intensidade de sinal das amostras S (sobrenadante) e T (tripsinizado) das amostras NPMs-células CaCo2 nos diferentes tempos de interação.

	1S (mV)	1T (mV)	2S (mV)	2T (mV)	3S (mV)	3T (mV)	4S (mV)	4T (mV)	5S (mV)	5T (mV)	6S (mV)	6T (mV)
1 h	0,26	0,03	0,66	0,20	0,88	0,02	0,77	0,13	0,77	0,16	0,52	0,03
6 h	0,68	0,02	1,20	0,03	0,77	0	2,37	0,08	1,02	0,08	0,38	0,03
12 h	0,58	0	1,31	0,02	0,77	0	2,38	0,06	0,97	0,08	0,47	0
24 h	0,60	0	1,38	0,01	2,02	0,1	2,03	0,02	1,18	0,07	0,43	0,02

- *Avaliação em diferentes tempos de interação célula-NPMs utilizando diferentes materiais encapsulados*

Na Figura 10, mostra que diferente dos resultados apresentados anteriormente, foi possível analisar uma diferença de intensidade de sinal das amostras sobrenadante nos diferentes grupos apresentados. Nesta etapa, houve uma mudança no protocolo na representação gráfica dos valores de intensidade de sinal adquiridos, pois foi avaliado que a substância DMEM isolada apresentava um valor de sinal considerável ao ser medido pelo sistema BAC. Assim, este valor -0,40 mV, negativo devido a presença de íons que compõe a amostra, foi normalizado em todos os valores de intensidade de sinal das amostras contribuindo para uma grande melhora nas análises. Além disso, as NPMs revestidas por citrato diferenciaram significativamente, em todos os tempos de interação, das NPMs revestidas por citrato encapsuladas por lipídio, eritrócito e b16. Este decaimento na intensidade de sinal, é decorrente de dois fatores: (i) Para a síntese de nanopartículas magnéticas (NPMs) encapsuladas, é essencial empregar uma concentração reduzida de NPMs, a fim de promover uma formação eficaz de vesículas lipídicas; (ii) Quando as nanopartículas magnéticas entram em contato com fluidos e substâncias biológicas, tendem a aglomerar-se devido às interações entre o revestimento das NPMs e as estruturas biológicas presentes. Esses processos de aglomeração são influenciados pelas propriedades físicas e químicas das NPMs, bem como pelas características do ambiente biológico

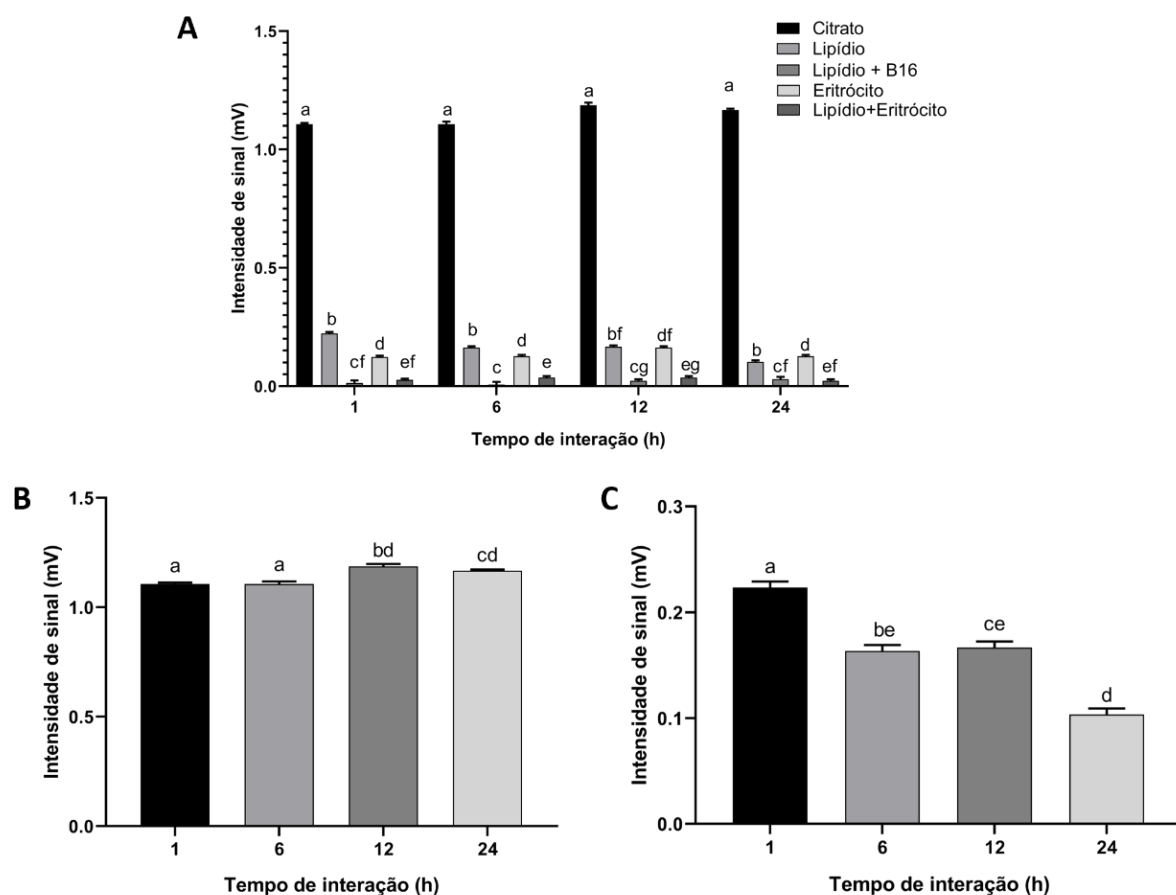


Figura 10.A) Intensidade de sinal das amostras sobrenadante dos diferentes grupos NPMs-células (Cit-MnFe₂O₄, Cit-MnFe₂O₄+Lip, Cit-MnFe₂O₄+Lip+Eri, Cit-MnFe₂O₄+Lip. +B16, Cit-MnFe₂O₄+Eri) nos tempos de interação avaliados (1 h, 6 h, 12 h e 24 h). (B) Intensidade de sinal das amostras sobrenadante do grupo Cit-MnFe₂O₄+Lip. (C) Intensidade de sinal das amostras sobrenadante do grupo Cit-MnFe₂O₄+Eri.

Com o intuito de complementar as análises da interação NPMs-células, foram analisadas imagens do microscópio invertido, mostrando diferenças no perfil da interação ao longo do tempo (Figura 11). Além disso, uma amostra do grupo Cit-MnFe₂O₄, e Cit-MnFe₂O₄+Lip foi levada para análise na Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 12). Os resultados indicam que as partículas podem estar passando pela membrana celular, porém métodos de quantificação precisam ser aplicados para melhores informações.

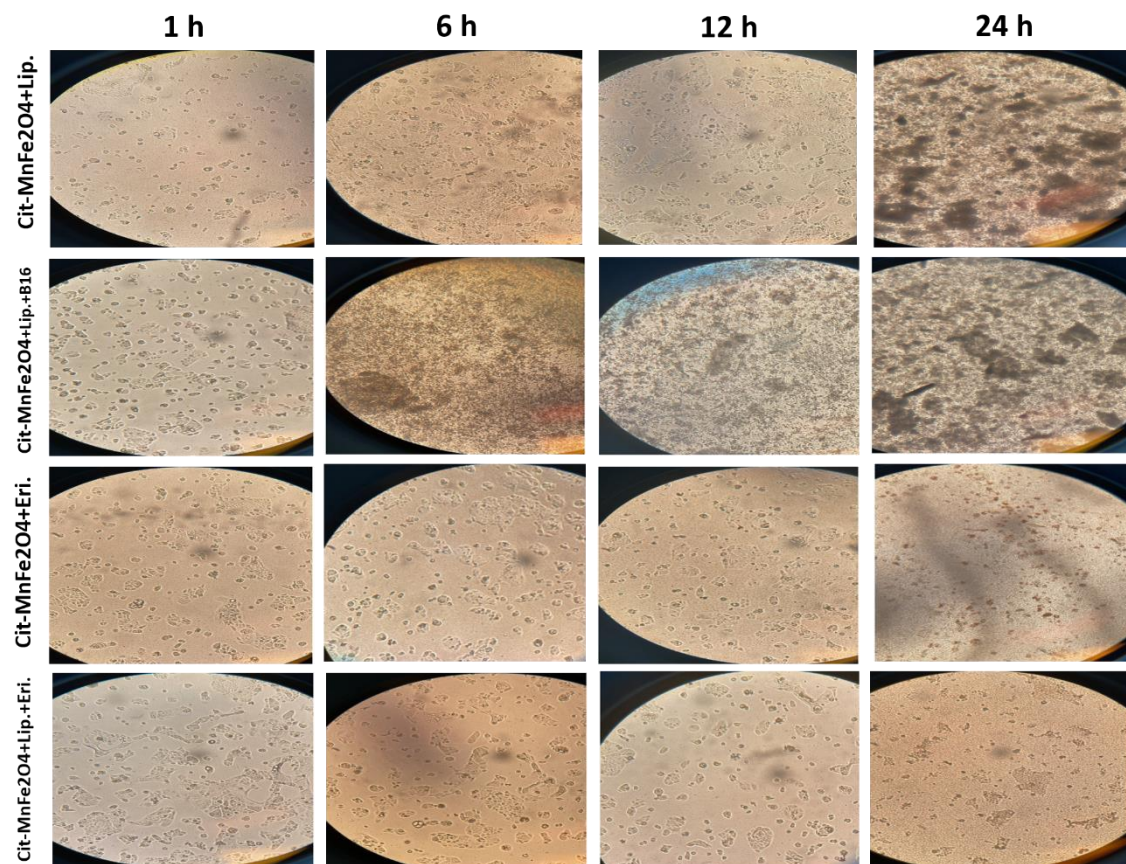


Figura 11. Imagem do microscópio invertido da interação NPMs-células CaCo2 dos diferentes grupos NPMs-células (Cit-MnFe₂O₄, Cit-MnFe₂O₄+Lip, Cit-MnFe₂O₄+Lip+Eri, Cit-MnFe₂O₄+Lip. +B16, Cit-MnFe₂O₄+Eri) nos tempos de interação avaliados (1 h, 6 h, 12 h e 24 h).

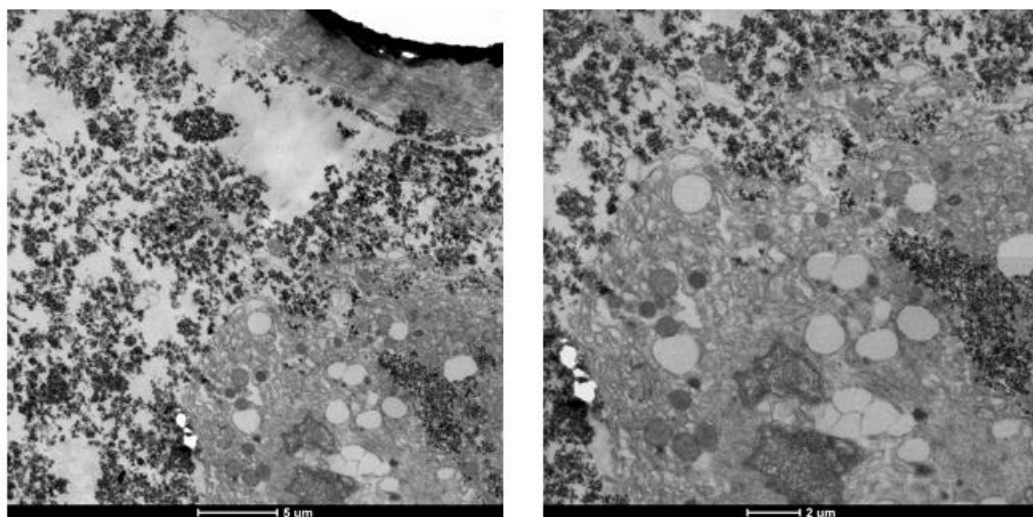


Figura 12. Imagem da microscopia eletrônica de transmissão da interação NPMs-células CaCo2 dos diferentes grupos NPMs-células no grupos Cit-MnFe₂O₄ e Cit-MnFe₂O₄+Lip com 24 h de interação.

- *Curva de Calibração BAC*

Para estabelecer uma relação quantitativa entre a intensidade do sinal do sensor BAC cavidade e a concentração das nanopartículas magnéticas, foi feita uma curva de calibração. Essa curva foi obtida através da medição da intensidade do sinal BAC cavidade em uma série de soluções com concentrações conhecidas de nanopartículas de ferrita de manganês, variando de 12,5% (7,25 mg/mL), decaindo em um fator de 1.5 até 0,127% (0,0074 mg/mL), totalizando 15 amostras. Todas as medidas foram realizadas com 300µL de nanopartículas magnéticas diluídas no recipiente e 350mA de corrente elétrica para excitação do sistema. Também foi utilizado um filtro amplificador, operando em frequência de 30kHz e 10x de ganho para amplificação do sinal.

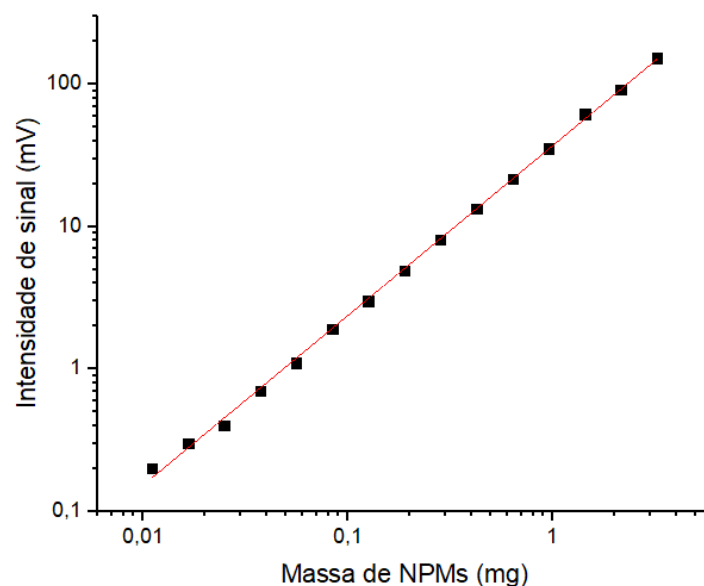


Figura 13. Curva de calibração de nanopartículas realizada com o sensor BAC cavidade, com um fit linear representado pela reta vermelha.

Os resultados da curva de calibração (Figura 13) demonstram uma correlação linear positiva entre a intensidade do sinal BAC cavidade e a concentração das nanopartículas.

- *Curva de Calibração EPR*

Buscando maior precisão na caracterização das nanopartículas magnéticas, realizou-se outra curva de calibração, desta vez utilizando o equipamento de espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR). A curva foi obtida através da realização de medidas de amostras seriadas com concentrações conhecidas, partindo de 100% decaindo em um fator de 2 até 0,390625%. Os parâmetros utilizados no equipamento foram padronizados para todas as amostras, a partir da configuração que foi capaz de detectar a amostra menos concentrada. Utilizou-se um campo magnético central de 3350G, sendo varrido por um tamanho de 400G ao longo de 1 minuto. Estabeleceu-se um protocolo com 5 varreduras por amostra, buscando minimizar a detecção de ruídos magnéticos, especialmente para as amostras menos concentradas. Além desses parâmetros, também foi utilizado um ganho de 5, amplitude de modulação 1.

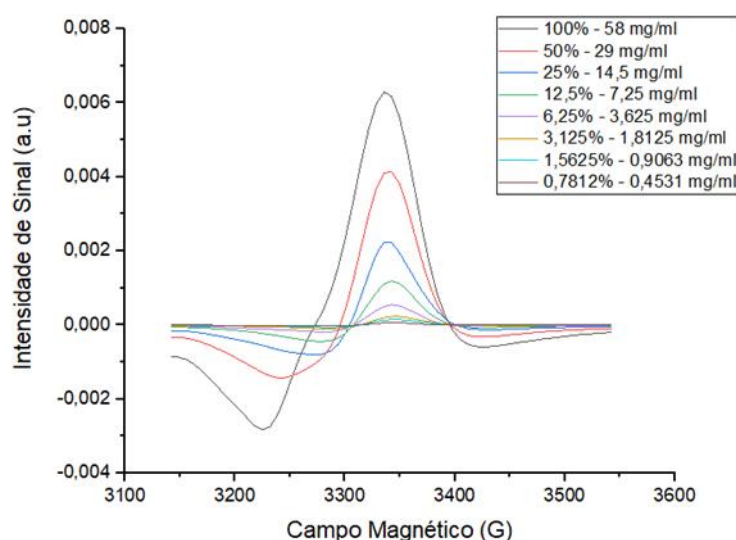


Figura 14. Curva de calibração de nanopartículas magnéticas realizada via EPR.

A frequência de ressonância registrada foi de 9,506 GHz, possibilitando a obtenção de um fator $g=2,028$, típico de nanopartículas magnéticas.

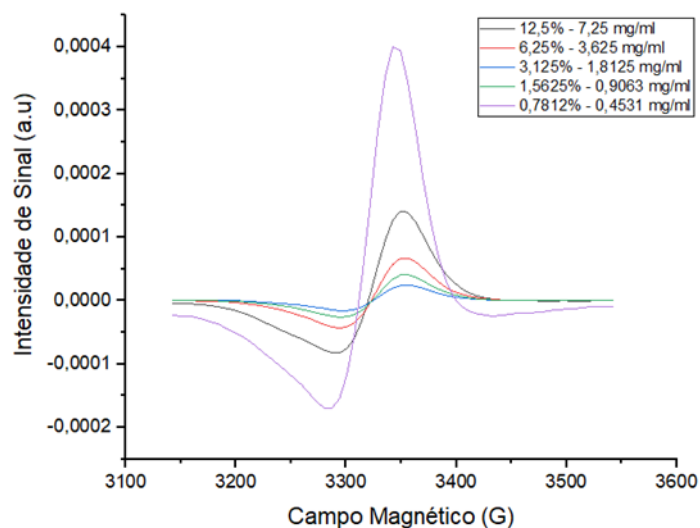


Figura 15. Curva de calibração de nanopartículas via EPR, destacando as amostras menos concentradas.

Novamente, os resultados mostram uma correlação linear positiva entre a intensidade do sinal EPR e a concentração das nanopartículas magnéticas (Figuras 15 e 16). As análises via EPR de diferentes concentrações revelam informações sobre as propriedades magnéticas das amostras. Variações de forma e largura nas linhas do espectro podem fornecer informações sobre a distribuição de tamanhos das nanopartículas, sua morfologia e presença de estados superficiais. Isso é valioso para otimizar o design de nanopartículas magnéticas para aplicações específicas, como marcação e internalização celular, liberação controlada de medicamentos e terapia magnética.

- *Experimento de Internalização Celular de Nanopartículas Magnéticas*

Análises via BAC Cavidade

As amostras foram separadas em dois grupos, conteúdo celular sobrenadante e conteúdo celular tripsinizado e ambos foram medidos ao longo dos tempos de 1 hora, 6 horas, 12 horas e 24 horas. Os parâmetros utilizados no sistema BAC foram os mesmos da curva de calibração, 350mA de corrente elétrica de excitação e o filtro amplificador operando em frequência de 30kHz e ganho de 10x.

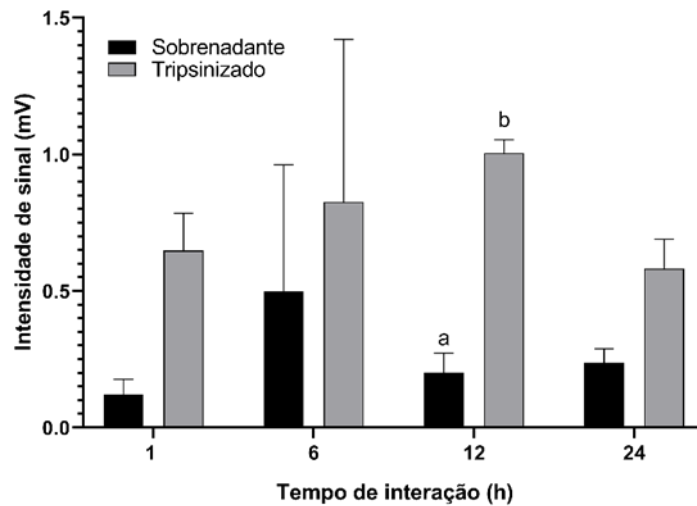


Figura 16. Intensidade de Sinal BAC Cavidade ao longo do tempo no experimento de internalização celular.

É possível observar na Figura 16 que houve um aumento da intensidade do sinal magnético em função do tempo para a amostra tripsinizada até o tempo de 12 hora, seguido de uma diminuição nessa intensidade de sinal ao chegar às 24 horas. Com relação à amostra sobrenadante, houve uma variação de intensidade de sinal em função do tempo, sendo a maior intensidade no tempo de 6 horas e a menor no tempo de 1 hora.

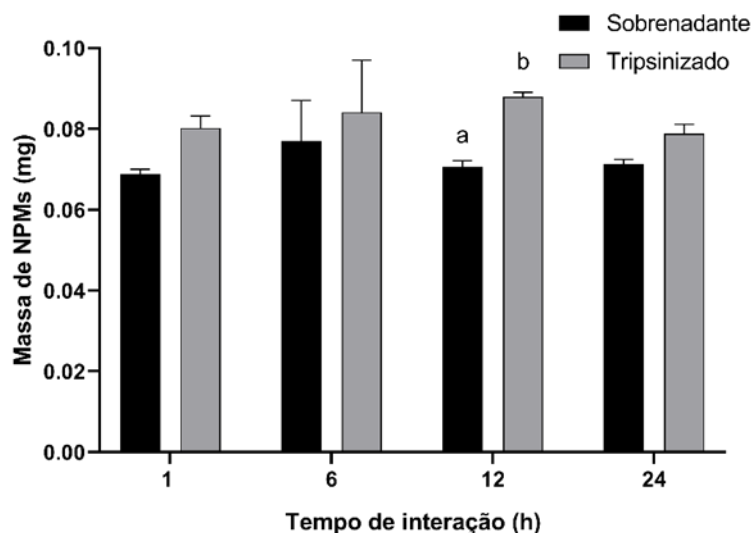


Figura 17. Perfil de intensidade de massa de nanopartículas magnéticas no experimento de internalização celular ao longo do tempo.

A Figura 19 mostra a variação da massa de partículas magnéticas nos dois grupos, sendo possível observar que ela se manteve constante nas amostras de sobrenadante ao longo das 24 horas, com exceção da amostra de 6 horas, que possui

um leve aumento. Com relação às amostras tripsinizadas, ocorreu o mesmo padrão identificado através das medidas em função da intensidade do sinal magnético, com um aumento gradual até o tempo de 12 horas e uma diminuição após 24 horas. Mostrando que a BAC é adequada para detecção de nanopartículas magnéticas em ambiente celular.

Análises via EPR

Seguindo o protocolo estabelecido nas medidas de calibração, utilizou-se 50µL de amostra ao longo dos tempos de 1 hora, 6 horas, 12 horas e 24 horas. O campo central foi fixado em 3350 G com 1000 G de varredura, amplitude de modulação em 1 e a potência em 10 mW. Devido à baixa concentração de nanopartículas magnéticas nas amostras de células, foram utilizados parâmetros diferentes dos anteriores, uma vez que se buscou otimizar o sinal através do ganho com um número de varreduras fixo em 5, possibilitando a utilização de diferentes ganhos para o mesmo tempo.

Inicialmente, utilizaram-se os ganhos 10^2 e 10^5 para as amostras de sobrenadante. Os resultados ainda não se encontram de forma satisfatória, uma vez que esses parâmetros de análise não foram otimizados. Entretanto, a utilização de uma segunda técnica torna-se promissora para a continuação da proposta.

Reserva Técnica utilizada:

- Compra de lipídios para síntese de lipossomas para o encapsulamento de nanopartículas magnéticas.

Valor: R\$ 1330,76

- Diárias: Apresentação de trabalho em Congresso Nacional (Congresso Brasileiro de Física Médica) referente a pesquisa desenvolvida pelo Bolsista

Valor: R\$ 2040,00

- Visita a Universidade Federal de Goiás, ao Laboratório do professor Andris Bakuzis. Realização de experimentos e discussão dos resultados obtidos como parte do projeto científico “Modelos in vitro e in vivo para avaliação do perfil de absorção e internalização de nanopartículas magnéticas para potencial aplicação biomédica”. Os experimentos foram: síntese e caracterização de nanopartículas

magnéticas e lipossomas, além do processo de associação entre as nanopartículas e os lipossomas.

Valor: R\$ 3725,00

- Visita a Universidade Federal de Goiás, ao Laboratório do professor Andris Bakuzis. Continuação das realizações da primeira Pesquisa de Campo, onde foi possível realizar novos experimentos e corrigir alguns que poderiam ser aprimorados. Além disso, foi realizada discussão científica entre os pesquisadores para a elaboração de um rascunho do artigo referente aos resultados obtidos até o momento